

REC'D 11 NOV 2004

WIPO

PCT

PU1/JP2004/014286

22.09.2004

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed
with this Office.

出願年月日 2003年 9月25日
Date of Application:

出願番号 特願2003-333363
Application Number:

[ST. 10/C] : [JP2003-333363]

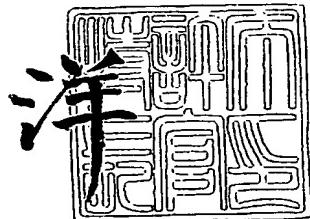
出願人
Applicant(s):
富山県
村口 篤
岸 裕幸
時光 善温
近藤 佐千子

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年10月28日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2004-3097461

【書類名】 特許願
【整理番号】 A35118H
【提出日】 平成15年 9月25日
【あて先】 特許庁長官 殿
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県高岡市二上町150 富山県工業技術センター内
 【氏名】 小幡 勤
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県高岡市二上町150 富山県工業技術センター内
 【氏名】 藤城 敏史
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市明輪町1-108-1301
 【氏名】 村口 篤
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町2556-4-3-101
 【氏名】 岸 裕幸
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市萩原552-1 アクアマリンM306号
 【氏名】 時光 善温
【発明者】
 【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町2556-4-3-103
 【氏名】 近藤 佐千子
【特許出願人】
 【識別番号】 000236920
 【氏名又は名称】 富山県
【特許出願人】
 【識別番号】 502413278
 【氏名又は名称】 村口 篤
【特許出願人】
 【識別番号】 502413289
 【氏名又は名称】 岸 裕幸
【特許出願人】
 【住所又は居所】 富山県富山市萩原552-1 アクアマリンM306号
 【氏名又は名称】 時光 善温
【特許出願人】
 【住所又は居所】 富山県富山市五福末広町2556-4-3-103
 【氏名又は名称】 近藤 佐千子
【代理人】
 【識別番号】 110000109
 【氏名又は名称】 特許業務法人特許事務所サイクス
 【代表者】 今村 正純
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 170347
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲**【請求項 1】**

複数個のマイクロウェルを有し、各マイクロウェルに1個の被検体生体細胞を格納して用いられるシリコン製のマイクロウェルアレイチップであって、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 2】

前記マイクロウェルは、円筒形、複数の面により構成される多面体、逆円錐形、若しくは逆角錐形またはこれらの2つ以上を組合せた形状である、請求項1に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 3】

マイクロウェルの平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウェルに格納しようとすむ生体細胞の直径の1~2倍の範囲であり、かつマイクロウェルの深さは、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の1~4倍の範囲である、請求項1または2に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 4】

生体細胞がリンパ球であり、抗原特異的リンパ球を1個単位で検出するために用いられるマイクロウェルアレイチップである請求項1~3のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 5】

マイクロウェルの内面がフロロカーボン膜または酸化シリコン膜で被覆されている請求項1~4のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【請求項 6】

1個のマイクロウェルに格納した1個の生体細胞がマイクロウェルから回収されるように用いられる請求項5に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【書類名】明細書

【発明の名称】マイクロウェルアレイチップ

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗原特異的リンパ球などの生体細胞の検出などに用いることができるシリコン製のマイクロウェルアレイチップに関する。特に、本発明のマイクロウェルアレイチップは、必要によりマイクロウェルに格納した生体細胞を容易に回収できるマイクロウェルアレイチップに関する。

【背景技術】

【0002】

従来、抗原特異的リンパ球は、例えば、96穴プレートを用いて、1穴あたり約200,000個のリンパ球を加えて3日から1週間、抗原の存在下で培養することにより検出していいた（非特許文献1及び2）。この方法では、約200,000個と言うリンパ球集団の中に抗原特異的リンパ球が存在することは確認できた。しかし、リンパ球集団中に存在する個々の抗原特異的リンパ球を同定することはできなかった。

【0003】

これに対して近年、蛍光色素で標識した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせることにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に蛍光標識抗原を結合させ、蛍光標識抗原を結合したリンパ球を、フローサイトメータを用いることにより検出する方法が開発され利用されている（非特許文献3）。この方法では抗原に結合する1個のリンパ球を同定することが可能である。さらに抗原に結合する1個のリンパ球を分取することも可能である。

【0004】

しかしながら、上記検出方法では、分取するためにはセルソーターという高価で複雑な機器が必要である上に、以下の問題もある。

(1) 分取するための機器の条件設定が難しく、細胞を分取するためには機器操作の熟練を要する。

(2) バックグラウンドが高いため抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合は抗原特異的リンパ球を検出できない。

(3) 細胞を分取する効率は低い。

(4) 頻度の低い細胞を分取するのに時間がかかる。

(5) 抗原が結合することは確認できるが、抗原が結合したリンパ球の反応を解析することは難しい。

【0005】

別の抗原特異的リンパ球検出法として、磁気ビーズに結合した抗原分子をリンパ球と混ぜ合わせることにより、抗原特異的リンパ球の抗原受容体に磁気ビーズ結合抗原を結合させ、磁石を用いて抗原特異的リンパ球を分取する方法も開発されている（非特許文献4）。

この方法では、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認できる。しかし、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応（細胞内シグナル伝達、RNA合成、タンパク質合成などの細胞の代謝生理反応）するかを解析することはできなかった。また、抗原特異的リンパ球の頻度が0.1%以下の場合は抗原特異的リンパ球を検出できなかった。

【非特許文献1】「リンパ球機能検索法」矢野純一、藤原道夫編著、中外医学社（1994年）

【非特許文献2】「免疫実験操作法I、II」右田俊介、緋田進、本庶佑、濱岡利之編集、南江堂（1995年）

【非特許文献3】Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes, Science, 274:94-96, 1996

【非特許文献4】Abts H, Emmerich M, Miltenyi S, Radbruch A, Tesch H, CD20 po

sitive human B lymphocytes separated with the magnetic sorter (MACS) can be induced to proliferation and antibody secretion in vitro. Journal of Immunological Methods 125:19-28, 1989.

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

それに対して、本発明者らは、複雑な装置は必要とせず、細胞の分取の時間は短時間であり、抗原が結合することも確認でき、頻度の低い抗原特異的リンパ球(0.001%以上)も検出でき、抗原が結合したリンパ球が抗原に反応するかを解析することができ、しかも抗原特異的リンパ球を分取できる抗原特異的リンパ球検出法を提供すること種々検討してきた。そして、1つ1つのリンパ球の抗原特異性を個別に検出し、さらに検出された抗原特異的リンパ球を回収する方法について開発を進めてきた。

しかし、従来は、1つ1つのリンパ球の抗原特異性を個別に検出し、さらに検出された抗原特異的リンパ球を回収することができるマイクロウェルアレイチップは知られていなかった。

【0007】

そこで本発明の目的は、上記検出法に利用可能な、1つのリンパ球を1つのマイクロウェルに収納可能なマイクロウェルアレイチップを提供することにある。

特に本発明は、マイクロウェルに収納した1つのリンパ球を容易に回収できるマイクロウェルアレイチップを提供することを目的とする。

さらに本発明は、リンパ球に限らず、生体細胞を1つのマイクロウェルに1つ収納可能なマイクロウェルアレイチップを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

上記課題を解決するための発明は以下の通りである。

[請求項1]複数個のマイクロウェルを有し、各マイクロウェルに1個の被検体生体細胞を格納して用いられるシリコン製のマイクロウェルアレイチップであって、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有するマイクロウェルアレイチップ。

[請求項2]前記マイクロウェルは、円筒形、複数の面により構成される多面体、逆円錐形、若しくは逆角錐形またはこれらの2つ以上を組合せた形状である、請求項1に記載のマイクロウェルアレイチップ。

[請求項3]マイクロウェルの平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の1~2倍の範囲であり、かつマイクロウェルの深さは、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の1~4倍の範囲である、請求項1または2に記載のマイクロウェルアレイチップ。

[請求項4]生体細胞がリンパ球であり、抗原特異的リンパ球を1個単位で検出するため用いられるマイクロウェルアレイチップである請求項1~3のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

[請求項5]マイクロウェルの内面がフロロカーボン膜または酸化シリコン膜で被覆されている請求項1~4のいずれか1項に記載のマイクロウェルアレイチップ。

[請求項6]1個のマイクロウェルに格納した1個の生体細胞がマイクロウェルから回収されるように用いられる請求項5に記載のマイクロウェルアレイチップ。

【発明の効果】

【0009】

本発明のマイクロウェルアレイチップは、各マイクロウェルがリンパ球のような被検体生体細胞を1個だけ含むことができ、それにより、例えば、抗原特異的リンパ球を1個1個の細胞レベルで特定することができる。即ち、本発明のマイクロウェルアレイチップを用いることで、抗原特異的リンパ球の検出においては、マイクロウェルに含まれる被検体リンパ球が1個であることから、抗原に反応する被検体リンパ球を1個の細胞として特

定できる。

【0010】

その結果、例えば、検出された抗原特異的リンパ球を取り出して、抗原特異的抗体遺伝子やT細胞受容体遺伝子をクローニングすることも可能になる。例えば、抗原特異的抗体遺伝子がクローニングできると、それを用いて大量にヒト型モノクローナル抗体を生産することができる。この抗体を感染症などの患者へ投与することにより、感染症などの治療、予防に用いることができると考えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

【マイクロウェルアレイチップ】

本発明のマイクロウェルアレイチップは、複数個のマイクロウェルを有し、各マイクロウェルに1個の被検体生体細胞を格納して用いられるシリコン製のマイクロウェルアレイチップであって、前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有する。

上記被検体生体細胞は、例えば、リンパ球であることができ、本発明のマイクロウェルアレイチップは、例えば、抗原特異的リンパ球を1個単位で検出するために用いることができる。

【0012】

マイクロウェルの形状や寸法には特に制限はないが、マイクロウェルの形状は、例えば、円筒形であることができ、円筒形以外に、複数の面により構成される多面体(例えば、直方体、六角柱、八角柱等)、逆円錐形、逆角錐形(逆三角錐形、逆四角錐形、逆五角錐形、逆六角錐形、七角以上の逆多角錐形)等であることもでき、これらの形状の二つ以上を組み合わせた形状であることもできる。例えば、一部が円筒形であり、残りが逆円錐形であることができる。また、逆円錐形、逆角錐形の場合、底面がマイクロウェルの開口となるが、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状である(その場合、マイクロウェルの底部は平坦になる)こともできる。円筒形、直方体は、マイクロウェルの底部は通常、平坦であるが、曲面(凸面や凹面)とすることもできる。マイクロウェルの底部を曲面とすることはできるのは、逆円錐形、逆角錐形の頂上から一部を切り取った形状の場合も同様である。

【0013】

マイクロウェルの形状や寸法は、マイクロウェルに格納されるべき生体細胞の種類(生体細胞の形状や寸法等)を考慮して、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞が格納されるように、適宜決定される。

1つのマイクロウェルに1つの生体細胞が格納されるようにするためには、例えば、マイクロウェルの平面形状に内接する最大円の直径が、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の1~2倍の範囲、好ましくは1.1~1.9倍の範囲、より好ましくは1.2~1.8倍の範囲であることが適當である。

また、マイクロウェルの深さは、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径の1~4倍の範囲、好ましくは1.1~1.9倍の範囲、より好ましくは1.2~1.8倍の範囲であることが適當である。

【0014】

マイクロウェルが円筒形の場合、その寸法は、例えば、直径5~100 μm であることができ、生体細胞がBリンパ球の場合、好ましくは、直径は5~15 μm である。また、深さは、例えば、5~100 μm であることができ、生体細胞がBリンパ球の場合、好ましくは、深さは5~40 μm であることができる。但し、マイクロウェルの寸法は、上述のように、マイクロウェルに格納しようとする生体細胞の直径とのマイクロウェルの寸法の好適な比を考慮して適宜決定する。

【0015】

1つのマイクロウェルアレイチップが有するマイクロウェルの数は、特に制限はないが、生体細胞がリンパ球の場合、抗原特異的リンパ球の頻度が10⁵個に1個から多い場合には

約500個であるという観点から、1cm²当たり、例えば、2,000~1,000,000個の範囲であることができる。

本発明のマイクロウェルアレイチップは、シリコン製である。シリコン製であることで、現在半導体集積回路制作技術の主流であるシリコン加工技術をそのまま応用することが可能であり、特に微細加工性、量産性、将来のセンサーを含めた分析回路等との集積化という意味で他の材料より優れている。

さらに本発明のマイクロウェルアレイチップは、シリコン製であって、基板表面は酸化シリコン膜で被覆されていることが、チップ表面の親水性、膜の安定性、量産性という観点から好ましい。シリコン表面は、通常、疎水性であり、細胞懸濁液を播種した際に、細胞懸濁液をはじく性質が有り、マイクロウェルへの生物細胞の格納が妨げられる場合がある。従って、酸化シリコン膜は、シリコンよりは親水性であり、かつ安定した膜であるという観点から好ましい。

【0016】

さらに、本発明のマイクロウェルアレイチップは、マイクロウェルの内面がフロロカーボン膜または酸化シリコン膜で被覆されていることが好ましい。

マイクロウェルの内面が、フロロカーボン膜または酸化シリコン膜のような不活性で排他的な表面を形成することで、生体細胞の接着を防ぐことができ、マイクロウェルからの生体細胞の回収が容易になるので好ましい。

【0017】

即ち、マイクロウェルなどで生体細胞を扱う場合、マイクロウェル内部での生体細胞の接着が問題となる。特に、マイクロウェル内の生体細胞をマイクロウェルから回収する際に生体細胞の接着は大きな問題である。この問題を解決するために、本発明では、生体細胞が接触するウェル内部に、フロロカーボン膜または酸化シリコン膜のような膜を形成することが好ましい。

【0018】

フロロカーボン膜は撥水性を有する膜であり、撥水性膜の形成は、ウェル内部のみであることが好ましく、マイクロウェルアレイチップのウェル以外の表面は、前述のように酸化シリコン膜（酸化シリコン膜）であることが好ましい。

また、酸化シリコン膜は、フロロカーボン膜のような撥水性は示さないが、生体細胞の接着を防止できる効果を有している。特に、乾燥酸素による高温熱酸化法で作製した酸化シリコン膜は、膜が緻密であり、フロロカーボン膜のような水玉ができる程の撥水性は示さないが、親水性と疎水性の中間の性質を示す。

通常、生体細胞は、溶液に分散させて取り扱うため、マイクロウェルアレイチップ全体が撥水性または疎水性の表面を有するとウェルへの生体細胞の格納が困難になる傾向がある。そのため、本発明では、ウェル以外の表面は酸化シリコン膜を被覆し、ウェル内部だけに選択的にフロロカーボン膜または酸化シリコン膜を形成すること好ましい。

【0019】

但し、通常の表面処理方法でフロロカーボン膜を形成する場合、ウェルの作製後に、膜形成をおこなう。そのため基板全体がフロロカーボン膜で覆われ、基板表面も撥水性となってしまう。そこで本発明では、以下の方法を採用する。この方法については、シリコン基板を用いたマイクロウェルアレイチップを例にとって説明する。

【0020】

シリコン基板にフォトリソグラフィによってマイクロウェルパターンを形成する。このときのフォトレジストハードニング温度は100°C以下でおこなう。次にドライエッティング用真空装置によって、マイクロウェルを形成する。マイクロウェルが作製されたことを確認したら、真空装置内にCF系のガスを導入し、プラズマCVDを行う。なお、プラズマCVDはエッティング装置をそのまま使用しても、また別筐体のCVD装置で行ってもよい。数分間成膜したら、基板を真空装置より取り出し、メタノール、アセトンなどの有機溶剤に浸漬する。これによりマイクロウェルパターンマスクとともにその上のフロロカーボン膜もリフトオフされ、マイクロウェル内壁にのみフロロカーボン膜が残される。エッチ

ングと成膜工程は、ガス種を変更するだけで同じ装置で対応が可能である。

【0021】

フロロカーボン膜の代りにウェル内面を、前述のように、シリコン酸化膜で被覆しても良い。フロロカーボン膜の代りにウェル内面をシリコン酸化膜で被覆しても、ウェルからの生体細胞の回収率の改善効果は得られる。

ウェル内面をシリコン酸化膜で被覆する方法について以下に説明する。

この場合、ウェルパターン形成後にフォトレジストを除去し、熱酸化膜等を形成すれば、ウェル内面をシリコン酸化膜で被覆したマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0022】

また、フロロカーボン膜またはシリコン酸化膜の代りに、ウェル内部にポーラスシリコンを形成することによっても、ウェル内面への生体細胞の接着抑制効果を持つマイクロウェルアレイチップが得られる。ポーラスシリコンは、ウェル内面を陽極化成などの方法で作製することができる。

【0023】

フロロカーボン膜、シリコン酸化膜、ポーラスシリコン以外にも、本発明のマイクロウェルアレイチップに、活性なシリコン表面を抑える処理を施すか、または膜を形成することもできる。

【0024】

実施例1

(フロロカーボン膜形成実施例)

図1は、本発明に係るマイクロウェルアレイチップの概略説明図である。シリコン基板1a表面上にマイクロウェルパターン1bを多数配列し、その各マイクロウェル1bのサイズは数ミクロンから数十ミクロンである。形成された各ウェル側壁には、CxNy系ガスによって形成されたフロロカーボン膜1cが形成されており、表面エネルギー低下効果によって不活性な状態になっている。疎水性を示すフロロカーボン膜1cは、マイクロウェル内部に選択的に成膜されておりシリコン最表面1dには存在しない。これによって、マイクロウェル1bに入った生体細胞Aは容易に接着しにくくなっている。マイクロウェル内部にフロロカーボン膜を設ける効果はマイクロウェルが深い時に特に顕著に表れる。

シリコン基板を使用したマイクロウェルアレイチップの作製工程を図2に示す。

(1)酸化シリコン膜2aが形成されたシリコン基板2bに、例えば東京応化工業(株)ノボラック樹脂系ポジ型フォトレジストOFPR-800を塗布2cし、マイクロウェルパターン2dを形成する。このとき、現像後の熱処理は通常より低温(100から110°C程度)でおこなう。

(2)プラズマドライエッティング装置にSF₆などのシリコンエッティングガスを導入することによって、シリコン基板2bをエッティングしマイクロウェル2eを形成する。

(3)同エッティング装置にCxNy系ガスを導入し、プラズマ成膜をおこなう。この時点でウェル内部、シリコン基板表面上にフロロカーボン膜2fが形成される。この工程は、プラズマCVD装置などに基板を搬送して同様の処理をしてもよい。

(4)装置から取り出した基板を、メタノールまたはアセトンなどの有機溶剤に浸漬してフォトレジストを取り除く。このときにレジスト上に形成されたフロロカーボン膜も一緒にリフトオフされる。

(5)シリコン基板最表面は酸化シリコン膜2a、ウェル内部が不活性なフロロカーボン膜2fが形成されたマイクロウェルアレイチップが得られる。

【0025】

上記方法で得られたマイクロウェルアレイチップについて、下記の方法でアレイ率(充填率)及び採取率を評価した。結果を表1に示す。表1には、ウェル内部にフロロカーボン膜が形成されていないマイクロウェルアレイチップの評価結果も示す。いずれのサンプルについても、ウェル径及び深さは同じものを選択した。また、播種した細胞濃度は10⁵ cel ls/μLである。

【0026】

細胞アレイ率（充填率）評価方法

1. マウスからリンパ球を採取。このとき、得られる細胞の濃度は、1マイクロリッターあたり $10^4 \sim 10^5$ 細胞 ($10^4 \sim 10^5 \text{ cells}/\mu\text{l}$) である。細胞は 保存するために、HBSS (Hanks' balanced salt solution)に入れておく。
2. 各細胞に蛍光染色をおこなう。各細胞を、測定に使用する蛍光スキャナーの励起波長 (532nm) に対して蛍光を発するCellTracker Orangeで染色をおこなう。
3. 染色した細胞をマイクロピペットでシリコンチップ上に播種する。播種は3回繰り返し、最後にウェルに入らなかった細胞を洗浄によって取り除く。
4. チップが乾燥しないようにカバーガラスで覆い、マイクロアレイスキャナーにて蛍光強度を読みとる。
5. チップ上の4500ウェルを選択し、そのうち蛍光発光しているウェルの数を数える。アレイ率（充填率）は以下の式で算出する。
アレイ率（充填率） = (蛍光を発しているウェル数/4500) × 100

【0027】

採取率評価方法

1. 上記細胞アレイ率評価法に基づいて、細胞をマイクロウエルアレイに播種する。
2. 任意複数個 (10~30個程度) のウェルを選び、マイクロマニピュレーターで細胞をウェルから取り出す。このとき、積極的に取り出すような事はせず、各ウェルに対する取り出し条件がばらつかない様に注意する。
3. 任意に選択したウェルの数に対して、細胞が取り出すことのできたウェルの数の割合を採取率として表す。

採取率 = (細胞を取り出すことが出来たウェルの数/任意に選択したウェルの数) × 100

【0028】

【表1】

| サンプル | A | B | C | D | E | F |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| アレイ（充填）率 | 99.4% | 99.2% | 99.2% | 99.4% | 99.3% | 98.9% |
| 採取率 | 0% | 10% | 6.7% | 50% | 30% | 89.8% |

サンプル仕様：ウェル径 $11\mu\text{m}$ 、深さ $30\mu\text{m}$

サンプルA～C：コーティングなし、エッティング時間：8min

サンプルD～F：コーティングあり、エッティング時間：8min+コーティング時間：1min

【0029】

実施例2

ウェル内に酸化膜（酸化シリコン）を有するマイクロウェルアレイチップの作製(図3参照)

- (1)酸化シリコン3aが形成されたシリコン基板3bに、例えば東京応化工業（株）ノボラック樹脂系ポジ型レジストOFPR-800を塗布し、マイクロウエルパターン3dを形成する。
- (2)プラズマドライエッティング装置にSF6などのシリコンエッティングガスを導入することによって、シリコン基板3bをエッティングしマイクロウェル3eを形成する。
- (3)装置より取り出した基板を硫酸と過酸化水素水の混合液などのレジスト剥離液で、基板上のフォトレジストを取り除く。
- (4)いわゆるRCA洗浄であるアンモニア洗浄（アンモニア+過酸化水素水+水）、塩酸洗浄（塩酸+過酸化水素水+水）で基板を洗浄する。
- (5)乾燥酸素雰囲気中の熱処理炉に導入して、1100°Cで30分間熱酸化処理をおこなう。
- (6)温度が下がったら、熱処理炉より取り出す。
- (7)ここでシリコン基板表面、ウェル内に酸化膜3fが形成出来、ウェル内に酸化膜（酸化シリコン）を有するマイクロウェルアレイチップが作製できる。

【0030】

上記方法で得られたマイクロウェルアレイチップについて、前記と同様の方法でアレイ

率（充填率）及び採取率を評価した。結果を表2に示す。いずれのサンプルについても、ウェル径及び深さは同じものを選択した。また、播種した細胞濃度は 10^5 cells/ μ Lである。

【0031】

【表2】

| サンプル | A | B | C | D | E | F |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| アレイ（充填）率 | 99.4% | 99.2% | 99.2% | 91.6% | 98.4% | 98.5% |
| 採取率 | 0% | 10% | 6.7% | 45% | 30% | 55.6% |

サンプルA～C：酸化膜なし。エッティング時間：8 min

サンプルD～F：酸化膜あり。エッティング時間：8min 酸化温度：1100°C 酸化雰囲気：
乾燥酸素 酸化時間 30min 酸化膜厚：63nm（シリコン結晶面(100)上）

【図面の簡単な説明】

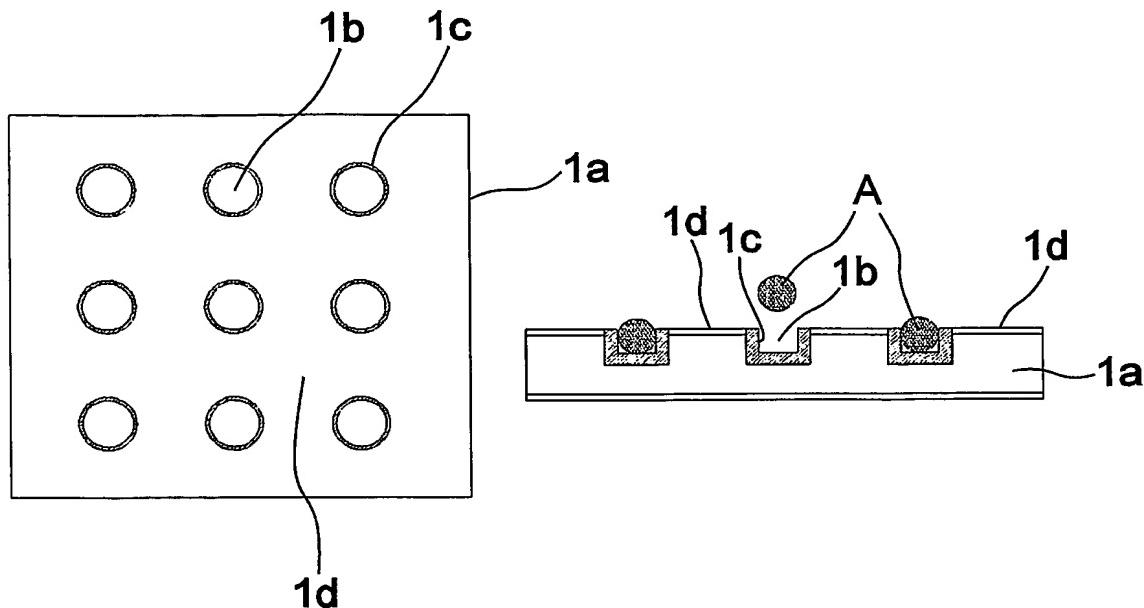
【0032】

【図1】ウェル内にフロロカーボン膜を有するマイクロウェルアレイチップの概略説明図。

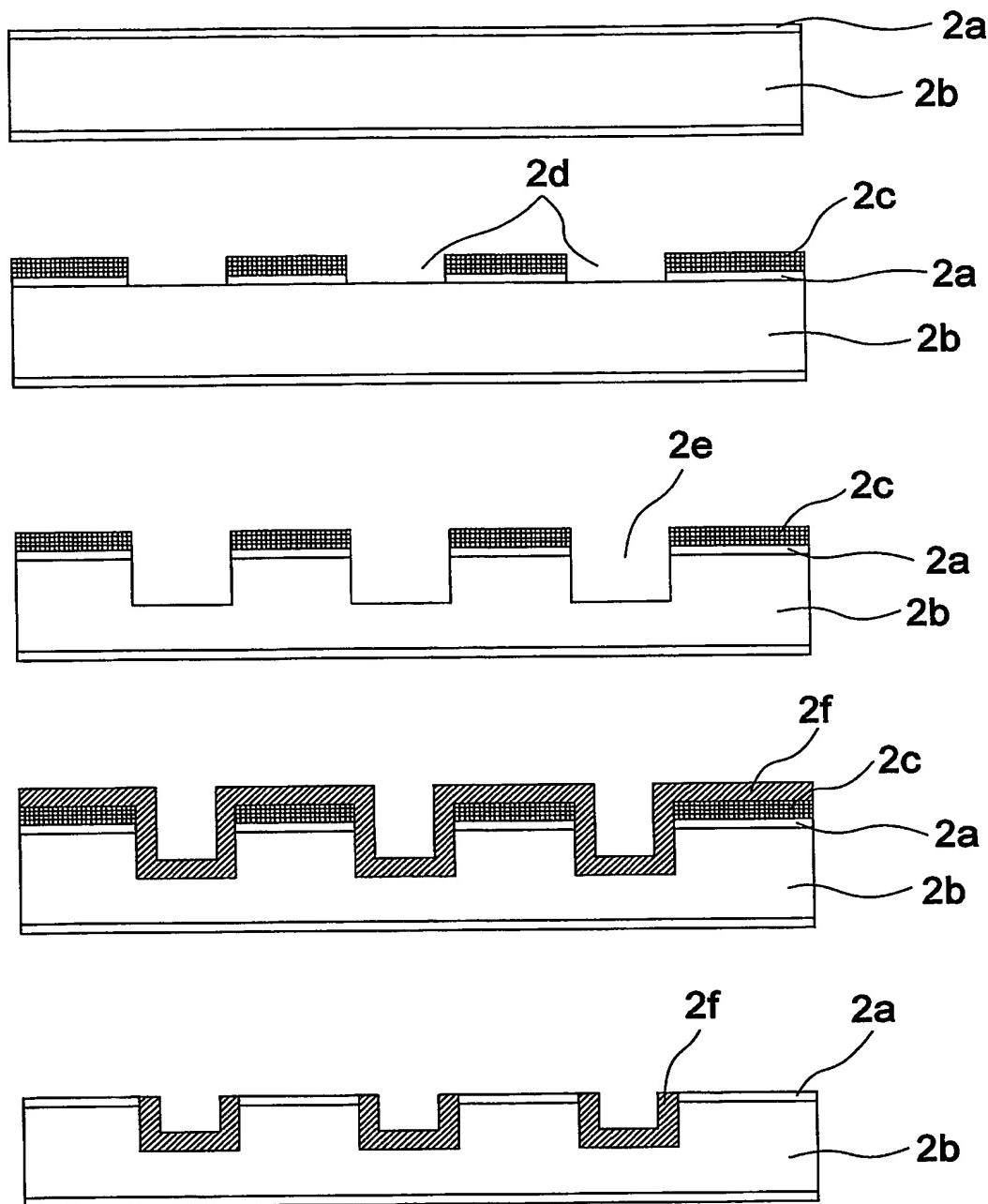
【図2】実施例1におけるウェル内にフロロカーボン膜を有するマイクロウェルアレイチップの作製方法の説明図。

【図3】実施例2におけるウェル内に酸化膜（酸化シリコン）を有するマイクロウェルアレイチップの作製方法の説明図。

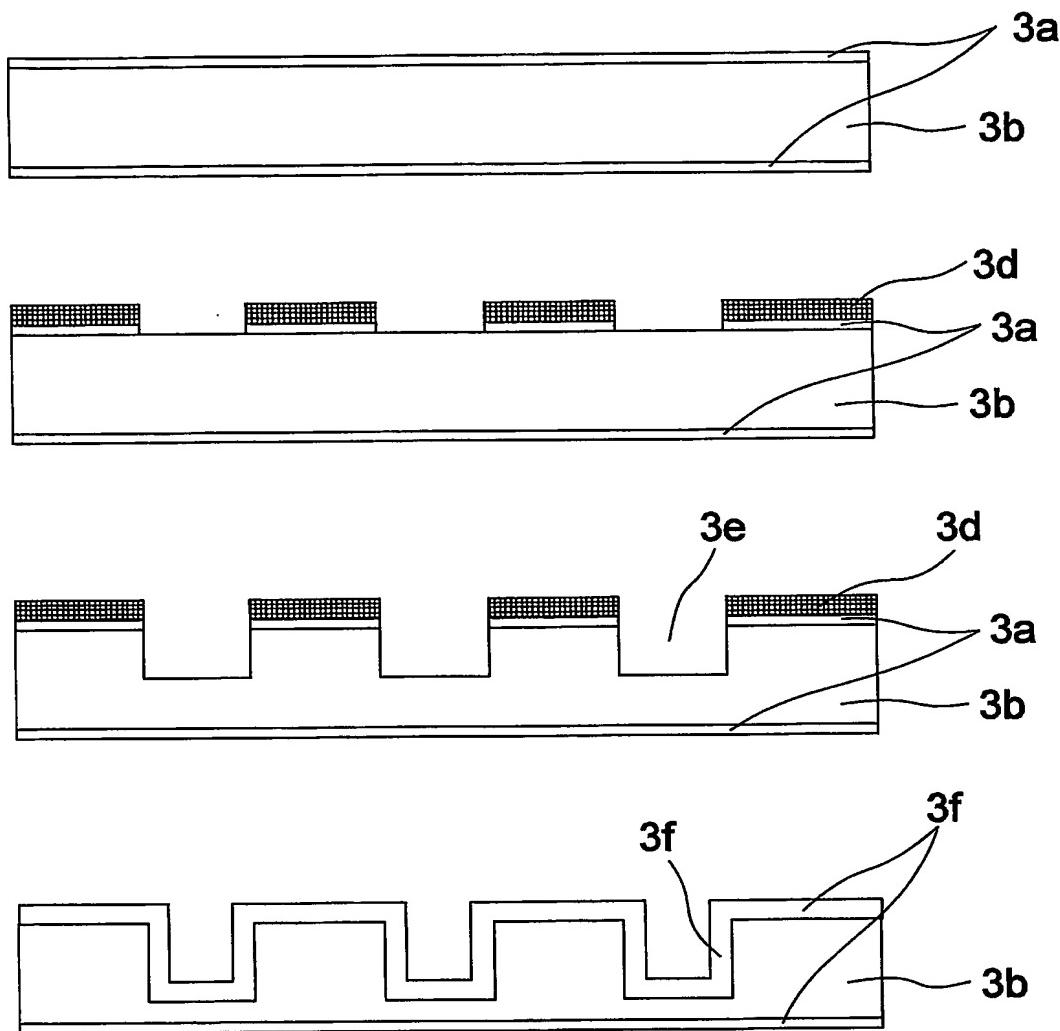
【書類名】図面
【図1】



【図2】



【図 3】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 1つ1つのリンパ球の抗原特異性を個別に検出する方法に利用可能な、1つのリンパ球を1つのマイクロウェルに収納可能なマイクロウェルアレイチップを提供すること。

【解決手段】 複数個のマイクロウェルを有し、各マイクロウェルに1個の被検体生体細胞を格納して用いられるシリコン製のマイクロウェルアレイチップ。前記マイクロウェルは、1つのマイクロウェルに1つの生体細胞のみが格納される形状及び寸法を有する。

【選択図】

特願 2003-333363

出願人履歴情報

識別番号 [000236920]

1. 変更年月日 1990年 9月 1日

[変更理由] 新規登録

住所 富山県富山市新総曲輪1番7号

氏名 富山県

特願 2003-333363

出願人履歴情報

識別番号 [502413278]

1. 変更年月日 2002年11月14日

[変更理由] 新規登録

住所 富山県富山市明輪町1-108-1301

氏名 村口 篤

特願 2003-333363

出願人履歴情報

識別番号 [502413289]

1. 変更年月日 2002年11月14日

[変更理由] 新規登録

住所 富山県富山市五福末広町2556-4-3-101
氏名 岸 裕幸

特願 2003-333363

出願人履歴情報

識別番号 [503349497]

1. 変更年月日 2003年 9月25日

[変更理由] 新規登録

住所 富山県富山市萩原552-1 アクアマリンM306号
氏名 時光 善温

特願 2003-333363

出願人履歴情報

識別番号 [503349501]

1. 変更年月日 2003年 9月25日

[変更理由]

新規登録

住所 富山県富山市五福末広町 2556-4-3-103

氏名 近藤 佐千子

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.